

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14569 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/55, (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).
15/82, A01H 5/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07884 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 12. August 2000 (12.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 39 688.4 20. August 1999 (20.08.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). STITT NIGEL, Marc [GB/DE]; Brückenstrasse 16, 68535 Edingen-Neckarhausen (DE). GEIGENBERGER, Peter, Ludwig [DE/DE]; Frauenpfad 31, 69221 Dossenheim (DE). LOEF, Irene [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 72, 69121 Heidelberg (DE). ZRENNER, Rita [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). SCHROEDER, Michael [DE/DE]; Talstrasse 23, 68259 Mannheim (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: INCREASING THE POLYSACCHARIDE CONTENT IN PLANTS

(54) Bezeichnung: ERHÖHUNG DES POLYSACCHARIDGEHALTES IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method of producing plants with an increased polysaccharide content that are obtained by overexpressing a gene of the pyrimidine metabolism.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Polysacchariden durch Überexpression eines Gens des Pyrimidinstoffwechsels.

WO 01/14569 A2

Erhöhung des Polysaccharidgehaltes in Pflanzen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für ein Dihydroorotase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Polysaccharid- bzw. Stärkegehalt, ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Polysaccharid bzw. Stärkegehalt durch Expression einer DNA-Sequenz codierend für eine Dihydroorotase, sowie die derart hergestellte Polysaccharide-überproduzierende Pflanze selbst. Weiterhin betrifft die Erfindung eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und mit dieser hybridisierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz codierend für eine Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum*.

Pflanzen synthetisieren ihre Zellkomponenten unter Nutzung der Sonnenenergie aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen. Nukleotide sind als elementare Bestandteile der Nukleinsäuren DNA und RNA insbesondere in schnell wachsenden Geweben essentiell und werden daher durch mehrstufige Stoffwechselwege synthetisiert. Pyrimidin-Nukleotide spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle als Kofaktoren im pflanzlichen Kohlenhydratstoffwechsel. Bis zu 80 % der Uridinnukleotide liegen als UDP-Zucker vor, die als aktivierte Vorstufen für Oligosaccharide oder z.B. für die Zellwandsynthese benötigt werden (Wagner und Becker, 1992, Int. Rev. Cyt., 134, 1-84). UDP-Glucose stellt beispielsweise die aktivierte Vorstufe zur Synthese der Sucrose dar. Sucrose dient der Pflanze als Transportform für Glucose, dem Monomer der Stärke, die in den Kartoffelknollen zur Speicherung synthetisiert wird.

Die an der Stärkebiosynthese beteiligten Enzyme sind weitgehend bekannt. In der Kartoffelknolle wird die über das vaskuläre System aus den Blättern zur Verfügung gestellte Saccharose hauptsächlich durch das Enzym Sucrose-Synthase in einer UDP-abhängigen Reaktion in UDP-Glucose und Fructose gespalten. Das Enzym Uridin-Diphosphoglucosepyrophosphorylase (UGPase) wandelt die UDP-Glucose in einer von Pyrophosphat abhängigen Reaktion zu Glucose-1-Phosphat und UTP um. Als aktiviertes Monomer zur Stärkesynthese durch das Enzym Stärke-Synthase dient ADP-Glucose. Dieses wird durch das Enzym ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) aus Glucose-1-Phosphat und ATP bereitgestellt.

In den letzten Jahren wurde auf verschiedene Weise versucht, den Stärkegehalt in transgenen Kartoffelpflanzen zu erhöhen. Im Hinblick auf dieses Ziel ohne Erfolg waren Ansätze zur Überexpression von Invertase aus Hefe (Sonnewald et al. 1997, Nature

Biotechnology 15: 794-797) sowie die kombinierte Expression von Glucokinase und Invertase in Kartoffelknollen (Trethewey et al. 1995, Plant J. 15: 109-118). Als erfolgreiche Ansätze zur Erhöhung der Stärkesynthese stellten sich die Überexpression einer AGPase (Stark et al. 1992, Science 258: 287-292), einer Pyrophosphatase aus E.coli (Geigenberger et al. 1998, Planta 205: 428-434) oder eines ADP/ATP-Translokators dar (Tjaden et al. 1998, Plant Journal 16: 531-540). Diese Ergebnisse reflektieren die Verschiedenartigkeit der für die Stärkesynthese limitierenden Faktoren.

Wenig ist zur Zeit bekannt zur Rolle der Pyrimidin-Konzentration sowie der Uridinnukleotid-Umsätze für die Sucrorespaltung und die Stärkesynthese in Kartoffelknollen. Studien von Merlo et al. (1993, J.Plant Physiol. 142: 392-402) erbrachten korellative Hinweise für eine parallele Regulation des Uridinnukleotidstoffwechsels mit dem Sucrose- und Stärkestoffwechsel zeigen jedoch keinen Weg auf gezielt die Stärkebiosynthese in Pflanzen zu steigern.

20 Aufgabe der Erfindung war es, den Polysaccharidgehalt in Pflanzenzellen zu erhöhen.

Die Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Expression eines Gens kodierend für eine Dihydroorotase (DHO) in den Plastiden transgener Pflanzen.

Erfindungsgemäß werden unter Polysacchariden vorzugsweise Stärke, Cellulose, Hemicellulose, Dextrane, Pektine, Mannane, Galactane, Xylane, Inuline und Fructane verstanden. Aber auch andere homogene oder heterogene Polysaccharide aufgebaut aus glykosidisch miteinander verknüpften nicht modifizierten oder modifizierten Monosacchariden der Glucose und der Fructose werden unter dem Begriff Polysaccharid verstanden.

35 Die Herstellung der transgenen Polysaccharide überproduzierenden Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem ein DHO-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanze für die Produktion von Polysaccharide-überproduzierenden Pflanzen wurden Tabak, Arabidopsis thaliana, Mais und Kartoffel eingesetzt.

40

Gene, die für eine Dihydroorotase kodieren, wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt aus einigen Organismen isoliert, u.a. aus Saccharomyces cerevisiae (Genbank Acc. Nr.: X 07561), aus Ustilago maydis (Genbank Acc. Nr.: X 63181), Arabidopsis thaliana (Genbank Acc. Nr.: AF 000146) und aus E.coli (Genbank Acc. Nr.: X 04469).

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung beispielsweise einer DNA-Sequenz aus *E. coli* (Genbank Acc.Nr. X04469), die für eine DHO oder deren funktionelle Äquivalente kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Polysacchariden. Die

- 5 Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DHO kodieren, homologen oder heterologen Ursprungs sind und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Polysacchariden
- 10 vorzugsweise Stärke verleihen.

Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete DNA-Sequenz ist beispielsweise eine DNA-Sequenz SEQ-ID No.1 und mit dieser hybridisierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen

- 15 homologen DNA-Sequenz kodierend für eine Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum*.

- Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in
- 20 der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden ko-
- 25 dierenden Sequenz für das DHO-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz
- 30 bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern,
- 35 in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

- 40 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

45

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator

- PNOS: Nopalín-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

5 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor
10 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),
15 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DHO-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward
20 et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein
25 durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
30 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Stärke bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI
35 Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995),
40 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen.
45 Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und

Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion
5 eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DHO-DNA-Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DHO-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise
10 in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,
15 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein
20 targeting in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

25

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DHO-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DHO-Gens in
30 die Chloroplasten vom DHO-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären DHO oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco
35 oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kar-
toffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem
40 ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA
45 ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCCG

TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGA
TCC_BamHI

pTP10

5 KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGCTG
GATCC_BamHI

10

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
15 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGG
ATCC_BamHI

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DHO kann syn-
thetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine

20 Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen ent-
halten, sowie aus verschiedenen heterologen DHO-Genabschnitten
verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthe-
tische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen
bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können
25 aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden,
die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert wer-
den. Bei der Präparation einer Expressionskassette können ver-
schiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Se-
quenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Rich-
30 tung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet
ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an
die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regio-
35 nen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker,
der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion die-
ser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker
1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions-
stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori-
40 schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger
als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ
bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze
sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkrip-
tionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DHO-Gen
45 codiert und eine Region für die transkriptionale Termination.

Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DHO-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von

S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DHO-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DHO kodierende DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen codierend für ein DHO-Gen oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Ziel der Verwendung ist die Erhöhung des Gehaltes an Polysacchariden vorzugsweise an Stärke in Pflanzen.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des DHO-Gens spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Polysaccharide-überproduzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette enthaltend eine erfindungsgemäße DHO-Gensequenz kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Polysacchariden vorzugsweise an Stärke eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-

transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DHO-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DHO kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DHO-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

45

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

5 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Stärke-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DHO-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-
10 setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DHO-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., Current Opinion in Biotechnology 8,
15 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C. et al., Journal of Molecular Biology 272, 336 - 347 (1997). Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen-
20 genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu
25 nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein DHO-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren
30 Hilfe ein Nachweis auf DHO-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DHO-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

35 Erhöhung des Polysaccharidgehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Stärke-Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des DHO-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer
40 Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Stärke beispielsweise ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DHO-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Stärkebio-
45 synthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in

fetthaltigen Samen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DHO-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DHO-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DHO-Gens und deren Auswirkung auf die Polysaccharid-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend eine DHO-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DHO-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- Verwendung einer DHO-DNA-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Polysaccharidgehalt durch Expression dieser DHO-DNA-Sequenz in Pflanzen.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren:

45

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

10

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (1987, Anal. Biochem. 163, 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt (1986, Anal. Biochem. 152, 304). Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert und nach Standardmethoden hybridisiert (Siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham). Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie mithilfe von X-OMAT AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht.

30

Beispiel 1

Erhöhung der Pyrimidin-Nukleotidkonzentration in Kartoffelknollenscheiben durch Fütterung mit Orotat oder Uridin.

35

Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée, Saatzucht Fritz Lange, Bad Schwartau) wurden in Wachstumskammern (Bestrahlungsstärke: 350 µmol Photonen m⁻²s⁻¹, 14 h / 10 h Tag- / Nacht-Rhythmus, Temperatur: 20 °C, 50 % relative Luftfeuchte) in 3 l Töpfen auf Erde (mit 100 g "Hakaphos grün" [BASF-AG, Ludwigshafen] pro 230 l) oder im Gewächshaus mit Zusatzlicht (150 µmol Photonen m⁻²s⁻¹) angezogen. Wachsende Knollen von täglich gewässerten Pflanzen wurden für die Experimente eingesetzt.

Knollenscheiben von 2 mm Dicke und 8 mm Durchmesser (ca. 0,1 g) wurden präpariert, wie in Geigenberger et al. (1997, Planta 201, 502-518) beschrieben. Nach dreimaligem Waschen mit 10 mM 2-(N-

morpholino)-Ethan-Sulfonsäure (Mes) (pH 6.5; KOH) wurden die Scheiben in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 90 upm im entsprechenden Medium (8 Scheiben in 4 ml) inkubiert. Nach 90 Minuten wurden [U-¹⁴C]-Glucose oder [U-¹⁴C]-Sucrose (1,1 kBq μ mol⁻¹; Amersham-Buchler) zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Die Scheiben wurden 3x in Puffer gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Knollenscheiben wurden mit 80 % (v/v) Ethanol extrahiert (1 ml für 2 Scheiben) und in drei Folgeschritten reextrahiert (80 % (v/v) Ethanol, 50 % (v/v) Ethanol, H₂O). Die kombinierten Überstände wurden bei 47 °C im Luftstrom getrocknet und in 1 ml H₂O aufgenommen. Diese lösliche Fraktion wurde wie bei Quick et al. (1989, Planta 177, 536-546) durch Ionenaustauschchromatographie in neutrale, basische und saure Fraktionen getrennt. Die neutrale Fraktion wurde nach Gefriertrocknung in 100 μ l H₂O aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (Geigenberger et al. 1997, Planta 201, 502-518). Zur Messung der Phosphatester wurden 150 μ l der löslichen Fraktion in 50 μ l Puffer (10 mM Mes, pH 6.5; KOH) mit oder ohne 1 U saurer Phosphatase aus Kartoffel (grade II, Boehringer, Mannheim) für 3 h bei 37 °C inkubiert und nach 2-minütigem Kochen durch Ionenaustauschchromatographie analysiert (Geigenberger et al., 1997). Nukleotidkonzentrationen wurden wie bei Geigenberger et al. beschrieben aus Trichloressigsäureextrakten durch HPLC-Analyse mittels einer Partisil-SAX Anionenaustauschersäule bestimmt. Aus dem unlöslichen Rückstand nach der Ethanolextraktion wurden Stärke, Protein und Zellwandkomponenten wie bei Merlo et al. (1993, J. Plant Physiol. 142: 392-402) beschrieben bestimmt.

Orotat und Uridin sind Vorstufen der Uridinnukleotide. Im Folgenden sollte die Frage untersucht werden, ob eine Fütterung mit Orotat oder Uridin einen Einfluß auf den Nucleotidgehalt in Knollenscheiben hat. Hierzu wurden Knollenscheiben 10 Wochen alter Kartoffelpflanzen für 3 Stunden in Gegenwart von 1 mM Glucose und der entsprechenden Uridinnukleotidvorstufen inkubiert. Anschließend wurden die Nukleotidgehalte gemessen.

Abbildung 2 zeigt die Nukleotidkonzentration in frisch präparierten Kartoffelknollenscheiben von wachsenden Knollen 10 Wochen alter Pflanzen ohne bzw. mit Fütterung verschiedener Nukleotidvorstufen (Inkubation für 3 Stunden in Gegenwart von 10 mM Mes-KOH (ph 6,5), 300 mM Mannitol und 1 mM Glucose. Im Vergleich zu nicht inkubierten Proben war eine Abnahme des Gesamtgehaltes an Uridinnukleotiden (UDPGlc + UTP + UDP; UMP war vernachlässigbar) um 30 - 40 % nach Inkubation mit 1 mM Glucose festzustellen (Abb. 2A). Eine Inkubation im gleichen Puffer, zusätzlich enthaltend 10 mM

Uridin oder 10 mM Orotat verhinderte den Effekt und führte darüber hinaus zu einer Zunahme des Gesamtgehaltes an Uridinnukleotiden von 15 - 25 %, die auf alle untersuchten Uridinnukleotide zurück ging (Abb. 2B, C, D). Dabei war in allen Experimenten die Erhöhung durch Gabe von Orotat geringfügig größer als durch Gabe von Uridin. Inkubation mit geringeren Konzentrationen an Orotat oder Uridin (5 mM) führten zu einer geringeren Erhöhung der Gesamt Uridinnukleotidkonzentration (nicht abgebildet).

- 10 Im Gegensatz zum Uridinnukleotidpool stieg die Konzentration an Adenylaten und Guanylaten (Abb. 2E,F) in kontrollinkubierten Scheiben (ohne Uridin bzw. Orotat) im Vergleich zu nicht inkubierten Scheiben leicht an. Diese Zunahme war unabhängig von einer Inkubation mit Orotat oder Uridin, was im Einklang mit der Annahme steht, daß Orotat und Uridin spezifische Vorstufen für die Uridinnukleotide und nicht für die Purinnukleotide darstellen. Andererseits bewirkte eine Inkubation mit 5 mM Adenin keine Erhöhung der Uridinnukleotide aber eine etwa 2fache Erhöhung der Gesamt-Adenylate und -Guanylate (Abb. 2E, F).

20

Diese Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, durch Fütterung von Uridinnukleotidvorstufen wie Orotat oder Uridin die Konzentration von Uridinnukleotiden in Pflanzenzellen zu erhöhen.

25 Beispiel 2

Erhöhung der Stärkesynthese in Kartoffelknollenscheiben durch Fütterung mit Orotat oder Uridin.

- 30 Um die Frage zu beantworten, ob erhöhte Konzentrationen an Uridinnukleotiden einen Effekt auf den Sucroseabbau und den Stärkegehalt haben, wurden Knollenscheiben mit 100 mM ^{14}C -Sucrose in Gegenwart sowie in Abwesenheit von 10 mM Orotat inkubiert. Ebenso wie in Gegenwart von Glucose führte die Fütterung mit Orotat zur Erhöhung der Uridinnukleotidkonzentrationen, ohne die Adenylat- und Guanylatkonzentrationen zu beeinflussen. Abb. 3 zeigt die Nukleotidkonzentration in frisch präparierten Kartoffelscheiben von wachsenden Knollen 10 Wochen alter Pflanzen ohne bzw. mit Fütterung von 10 mM Orotat (Inkubation für 3 Stunden in Gegenwart von 10 mM Mes-KOH (pH6,5) und 100 mM Sucrose. Abbildung 4 zeigt die Metabolisierung von ^{14}C - Sucrose frisch präparierter Kartoffelknollenscheiben von wachsenden Knollen 10 Wochen alter Pflanzen ohne bzw. mit Fütterung von 10 mM Orotat (Inkubation für 90 Minuten in Gegenwart von 100 mM Sucrose. Anschließende Zugabe von ^{14}C - Sucrose (1,1 kBq μmol^{-1}) und Inkubation für weitere 2 Stunden). Orotat führte zu einer geringfügigen Steigerung der Aufnahme von ^{14}C -Sucrose (Abb. 4A) sowie einer 2-fachen Zunahme der

- ¹⁴C-Sucrose Degradation (von 8 % der absorbierten Radioaktivität in Abwesenheit von Orotat auf 15 % - 18 % in Anwesenheit von Orotat, Abb. 4B). Die Orotatfütterung führte zu einer Steigerung des Einbaus an Radioaktivität in Stärke (Abb. 4C), sowie einer Abnahme des Einbaus in Phosphatester (Abb. 4E), organische Säuren (Abb. 4F) und freie Aminosäuren (Abb. 4G). Der Einbau in Zellwandkomponenten und Proteine blieb im Wesentlichen unverändert (Abb. 4D, H).
- 10 Orotat führte insgesamt zu einer 2,4-fachen Steigerung des absoluten Flux an Sucrose in Stärke (Tab. 1).

- Berechnung der absoluten Stärkesyntheserate in An- und Abwesenheit von Orotat über die spezifische Aktivität des Hexosephosphat-Pools. Die spezifische Aktivität wurde errechnet, indem die gemessene Radioaktivität in Phosphatestern durch die Summe des Kohlenstoffs im Hexosephosphat-Pool (Glucose-6-Phosphat + Fructose-6-Phosphat + Glucose-1-Phosphat; Daten nicht gezeigt) geteilt wurde. Mittelwerte +/- Standardabweichung (n = 4)

20

Tabelle 1

	Kontrolle	10 mM Orotat
25 Spezifische Aktivität im Hexosephosphat-Pool [Bq*nmol ⁻¹]	0,254 +/- 0,049	0,346 +/- 0,033
Stärkesyntheserate [nmol (g FW) ⁻¹ (2h) ⁻¹]	620 +/- 245	1483 +/- 262

30 Beispiel 3

Erzeugung transgener Tabakpflanzen

- Zur Erzeugung transgener Tabakpflanzen wurden binäre Vektoren in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar.
- 45 Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l

Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylelessigsäure und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

5

Beispiel 4

Sequenzanalyse der cDNA Klone codierend für ein Protein mit Dihydroorotase Aktivität.

10

Die resultierenden 36 cDNA Klone codieren für ein Polypeptid mit Homologie zu Dihydroorotasen aus anderen Organismen. Die Homologie wurde mit dem Programm BLASTP erhalten. (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25, 3389-3402). Demnach ist das Protein zu 78 % identisch zur Dihydroorotase aus *Arabidopsis thaliana*, 58 % zu *Synechocystis*, 55% zu *E. coli* und *Pseudomonas putida*. Der längste Klon wurde pyrCSt5 genannt. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pBSSK-pyrCSt5. Die cDNA (siehe SEQ-ID No. 1) hat einen offenen Leseraster von 1046 Basenpaaren mit einem Stop-

20 Codon in Position 1047-1049. Die Aminosäuresequenz beginnt mit der dritten Base im Leseraster und kann in ein 348 Aminosäuren langes Polypeptid übersetzt werden (siehe SEQ-ID No. 2). Dies entspricht der Länge prokaryotischer Dihydroorotase-codierender Sequenzen.

25

Beispiel 5

Isolation einer cDNA codierend für eine funktionelle pflanzliche Dihydroorotase

30

Ein Klon codierend für Dihydroorotase wurde aus Kartoffel über funktionelle Komplementation einer *E. coli* Mutante erhalten. Es wurde die Mutante CGSC5152 (CS101-2U5) des *E. coli* Genetic Stock Centers verwendet, die eine Mutation im pyrC Genlokus codierend für eine Dihydroorotase trägt. Die Komplementation erfolgte durch Elektrotransformation kompetenter Zellen des Stammes CGSC5152 mit einer cDNA Bank in dem Vektorplasmid pBS SK-. Die zugrunde liegende Lambda ZAPII Bank (Stratagene) wurde nach Standardvorschriften ungerichtet mit EcoRI/NotI Linkern kloniert. Die RNA-

40 Matrize für die cDNA wurde aus sink leaves von Kartoffel (kleiner 1 cm Blättchen von 10 Wochen alten Kartoffelpflanzen geerntet im Gewächshaus gezogen) isoliert.

Die transformierten *E. coli* Zellen wurden auf Minimalmedium M9 plattiert (Sambrook et al., 1989 s.o.), das zusätzlich Methionin (20 mg/l), Ampicillin (100 mg/l) und IPTG (2.5 mM) enthielt. Es wurden insgesamt 4 Microgramm der Bank in 8 Ansätzen transfor-

miert und es konnten 36 Klone erhalten werden, die sich nach Untersuchung durch Restriktionsspaltung als gleich erwiesen.

Beispiel 6

5

Erzeugung transgener Pflanzen, welche ein Enzym mit Dihydroorotase-Aktivität aus Kartoffel überexprimieren.

10

Es wurde eine cDNA hergestellt, die für ein Enzym mit Dihydroorotase-Aktivität aus Kartoffel codiert, das an eine zum Import des Proteins in die Plastiden führende Signalsequenz (entnommen einem Enzym mit Transketolase-Aktivität aus Tabak) fusioniert wurde.

15

Hierzu wurden zunächst anhand der pBSSK-pyrCSt5 cDNA die Oligonukleotide 5'-GTCGACATGGAGCTCTCAATCACACAACC-3' und

20

5'-GTCGACACACCTACAGTCTATATCTTTGG-3' für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) abgeleitet. Durch eine PCR mit pBSSK-pyrCSt5 als Matrize wurden SalI-Restriktionsschnittstellen vor dem Startcodon sowie nach dem Stopcodon der Dihydroorotase cDNA eingeführt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/ μ mol Matrizen DNA, 0,5 μ mol der Oligonukleotide und, 200 μ mol Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C, 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/ μ mol Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) und wurden in einer PCR-Maschine der Firma Perkin Elmer mit folgendem

25

Temperaturprogramm inkubiert:

Anlagerungstemperatur: 50°C, 45 sec

Denaturierungstemperatur: 95°C, 45 sec

30

Elongationstemperatur: 72°C, 120 sec

Anzahl der Zyklen: 30

35

Das erhaltene Fragment von ca. 1,1 kbp wurde in den mit EcoRV gespaltenen Vektor pBluescript SK- (Stratagene) ligiert. Durch Kontrollspaltung wurde ein Klon identifiziert K4, dessen Insert durch SalI in voller Länge exzisiert ist (1118 bp). Das Insert K4 wurde vollständig sequenziert, um Polymerasefehler auszuschließen.

40

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein Transfervektor erzeugt, indem das 1118 bp SalI-Fragment aus K4 in den mit SalI gespaltenen Vektor pTK-TP-BinAR9 (R. Badur, 1998 Doktorarbeit, Universität Göttingen) ligiert wurde. Die Orientierung des Inserts wurde durch Spaltung mit KpnI kontrolliert (es resultierte

45

ein Fragment von ca 980 bp). Auf diese Weise wurde eine Fusion des Leserasters der Dihydroorotase aus Kartoffel an ein plastidäres Transitpeptid, bestehend aus den N-terminalen 60 Aminosäuren

der Transketolase aus Tabak (Genbank Acc.#CAA03393) erreicht (Konstrukt K5). Die fusionierte cDNA Sequenz steht unter Kontrolle des Blumenkohlmosaik-Virus 35S-Promoters und des Octopinsynthese-Terminators aus *Agrobacterium tumefaciens*.

5

Das Konstrukt K5 wurde zur Transformation von Tabak, *Arabidopsis thaliana* und Kartoffelpflanzen eingesetzt.

Beispiel 7

10

Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte wie bei Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. in *Planta*, *Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*, C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316(1993), 1194 - 1199 beschrieben.

15

Beispiel 8

20

Die Transformation von Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*, cv. Desirée) erfolgte wie bei Dietze et al., in *Gene Transfer to Plants*, 1995, Potrykus und Spangenberg (Editoren), Springer, Berlin, beschrieben.

25

Beispiel 9

Die Transformation von Maispflanzen erfolgte wie bei Paredy, D., Petolino, J., Skokut, T., Hopkins, N., Miller, M., Welter, M., Smith, K., Clayton, D., Pescitelli, S., Gould, A., *Maize Transformation via Helium Blasting*. *Maydica*. 42(2): 143-154, 1997, beschrieben.

30

Beispiel 10

35

Erzeugung transgener Pflanzen, welche ein Enzym mit Dihydroorotase-Aktivität überexprimieren.

Es wurde eine cDNA hergestellt, die für ein Enzym mit Dihydroorotase-Aktivität aus *E.coli* codiert, das an eine zum Import des Proteins in die Plastiden führende Signalsequenz (entnommen einem Enzym mit Transketolase-Aktivität aus Tabak) fusioniert wurde. Hierzu wurde zunächst anhand der cDNA für die Dihydroorotase aus *E.coli* (Genbank Acc.Nr. X04469) die Oligonukleotide 5'-GTCGACAT-
45 GACTGCACCATCCCAGG-3' und 5'-CGATTTTATTGTTTAACGGACC-3' für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) abgeleitet. Durch eine PCR mit genomischer DNA aus *E.coli* XL-1 blue als Matrize wurde eine SalI-

Restriktionsschnittstelle vor dem Startcodon der Dihydroorotase cDNA eingeführt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/ μ l Matrizen DNA, 0,5 μ M der Oligonukleotide und, 200 μ M Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C, 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/ μ l Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) und wurden in einer PCR-Maschine der Firma Perkin Elmer mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Anlagerungstemperatur:	50°C, 45 sec
10 Denaturierungstemperatur:	95°C, 45 sec
Elongationstemperatur:	72°C, 120 sec
Anzahl der Zyklen:	30

Das erhaltene Fragment von 1059 bp wurde in den mit EcoRV gespal-

15 tenen Vektor pBluescript SK- (Stratagene) ligiert. Durch Kontrollspaltung wurde ein Klon identifiziert K1, dessen Insert durch SalI in voller Länge exzisierbar ist (1059 bp + 18 bp der "multiple cloning site" des Vektors).

20 Zur Überprüfung der Funktionalität des codierten Enzyms, wurde das 1077 bp SalI-Fragment aus K1 in den Expressionsvector pQE-9 (Quiagen) ligiert. Die korrekte Orientierung des Fragmentes wurde durch Restriktionsspaltung mit BamHI kontrolliert. Mit dem erhaltenen Konstrukt K2 wurde die pyrC E.coli Mutante CGSC#5152

25 (E.coli genetic stock center, York) transformiert. Die Transformanten wuchsen auf M9-Minimalmedien mit 20mg/l Methionin ohne Uridin, während Mutanten, die mit dem leeren pQE-9 Vektor transformiert wurden unter diesen Bedingungen kein Wachstum zeigten.

30 Für die Transformation von Pflanzen wurde ein Transfervektor erzeugt, indem das 1077 bp SalI-Fragment aus K1 in den mit SalI gespaltenen Vektor pTK-TP-BinAR9 (R. Badur, 1998 Doktorarbeit, Universität Göttingen) ligiert wurde. Auf diese Weise wurde eine Fusion des Leserasters der Dihydroorotase aus E.coli an ein pla-

35 stidäres Transitpeptid, bestehend aus den N-terminalen 60 Aminosäuren der Transketolase aus Tabak (Genbank Acc.#CAA03393) erreicht (Konstrukt K3, Abb. 5). Die fusionierte cDNA Sequenz steht unter Kontrolle des Blumenkohlmosaik-Virus 35S-Promoters und des Octopinsynthase-Terminators aus Agrobacterium tumefaciens.

40

Das Konstrukt K3 wurde zur Transformation von Tabak, Arabidopsis thaliana und Kartoffelpflanzen eingesetzt.

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Cla-

45 foran erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus (wie oben beschrieben) auf Dihydroorotase-Expression mittels

Northern-blot Analyse untersucht. Linien mit erhöhten RNA-Spiegeln der Dihydroorotase wurden auf veränderte Metabolit- und Stärkegehalte in Blattgeweben bzw. Knollen untersucht. Es ließ sich in den transgenen Linien ein erhöhter Gehalt an Uridinnukleotiden und ein erhöhter Stärkegehalt im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen feststellen.

10

15

20

25

30

35

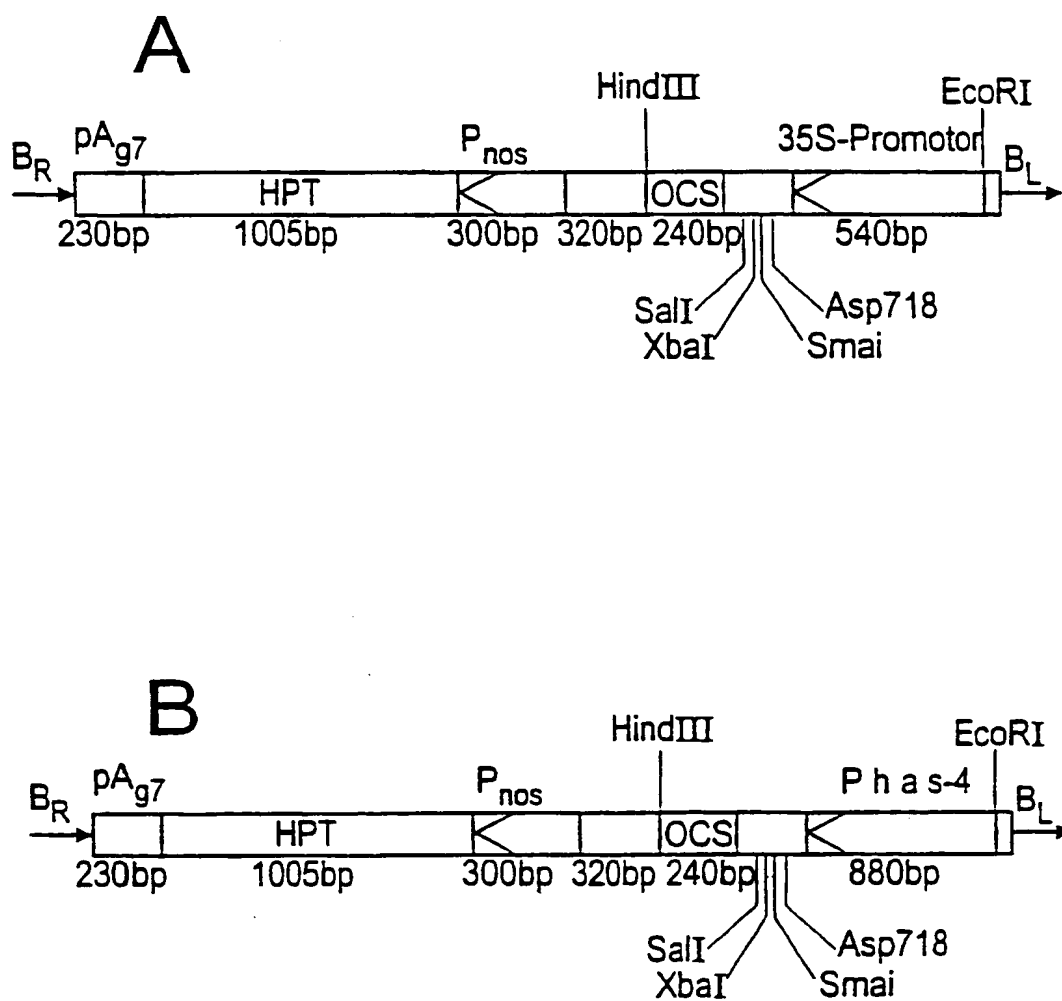
40

45

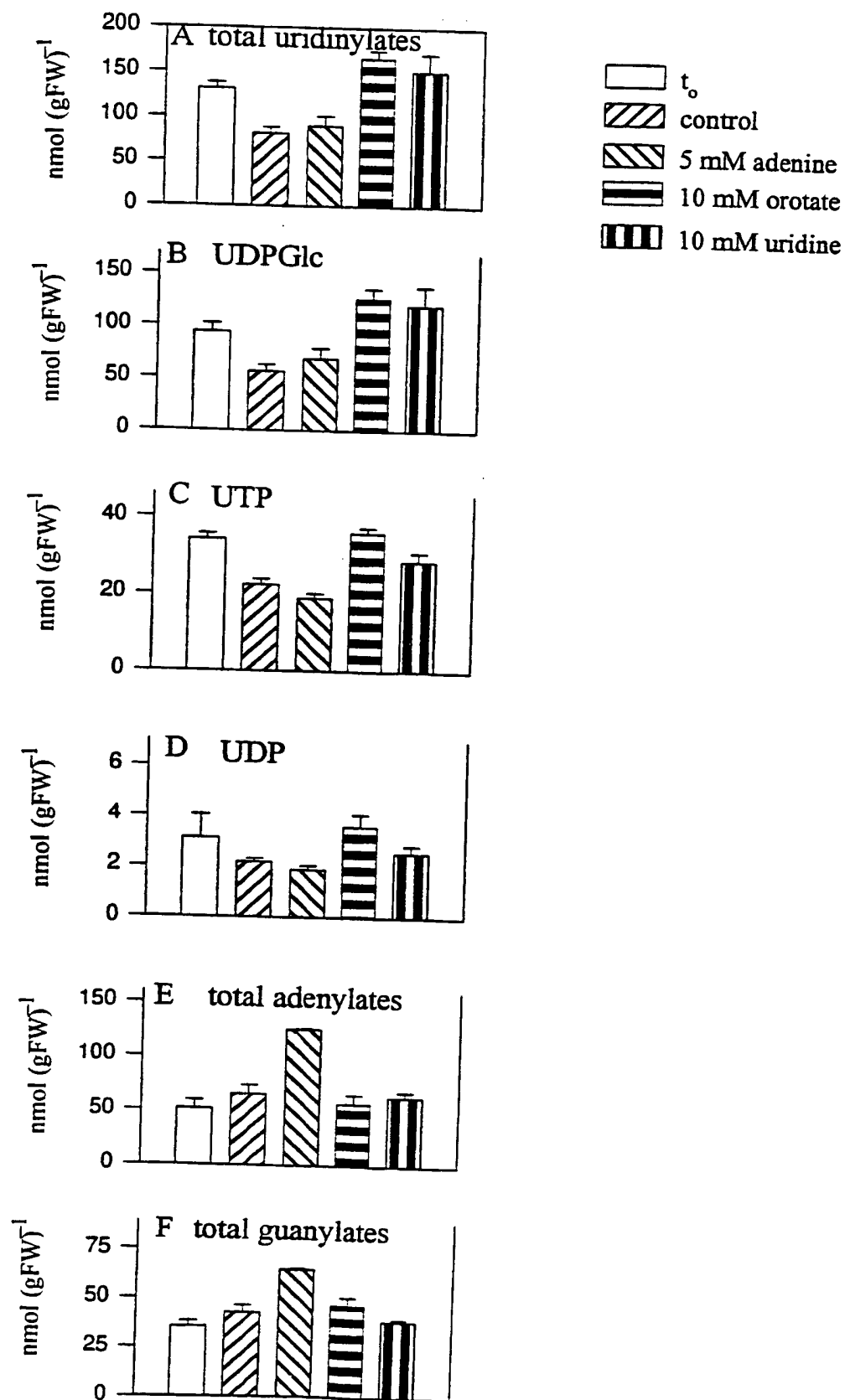
Patentansprüche

1. Verwendung einer DNA-Sequenz codierend für eine Dihydroorotase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Polysaccharidgehalt.
5
2. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Stärke.
10
3. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und mit dieser hybridisierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz kodierend für eine Dihydroorotase aus Solanum tuberosum gemäß Anspruch 1 oder 2.
15
4. DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und mit dieser hybridisierende oder zur Gesamtsequenz oder zu Teilsequenzen homologen DNA-Sequenz kodierend für eine Dihydroorotase aus Solanum tuberosum.
- 20 5. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Polysaccharidgehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz codierend für eine Dihydroorotase in Pflanzen exprimiert wird.
- 25 6. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor, eine Signalsequenz und eine DNA-Sequenz codierend für eine Dihydroorotase in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
30
7. Verfahren zur Transformation von Pflanzen mit einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
35
8. Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Polysacchariden enthaltend eine DNA-Sequenz codierend für eine Dihydroorotase gemäß Anspruch 4.
40
9. Pflanze nach Anspruch 8, ausgewählt aus der Gruppe Tomate, Tabak, Kartoffel, Tapioka, Maniok, Reis, Gerste, Hafer, Roggen, Weizen und Mais.
45

Zeichn.

FIG.1

2/5

FIG.2

3/5

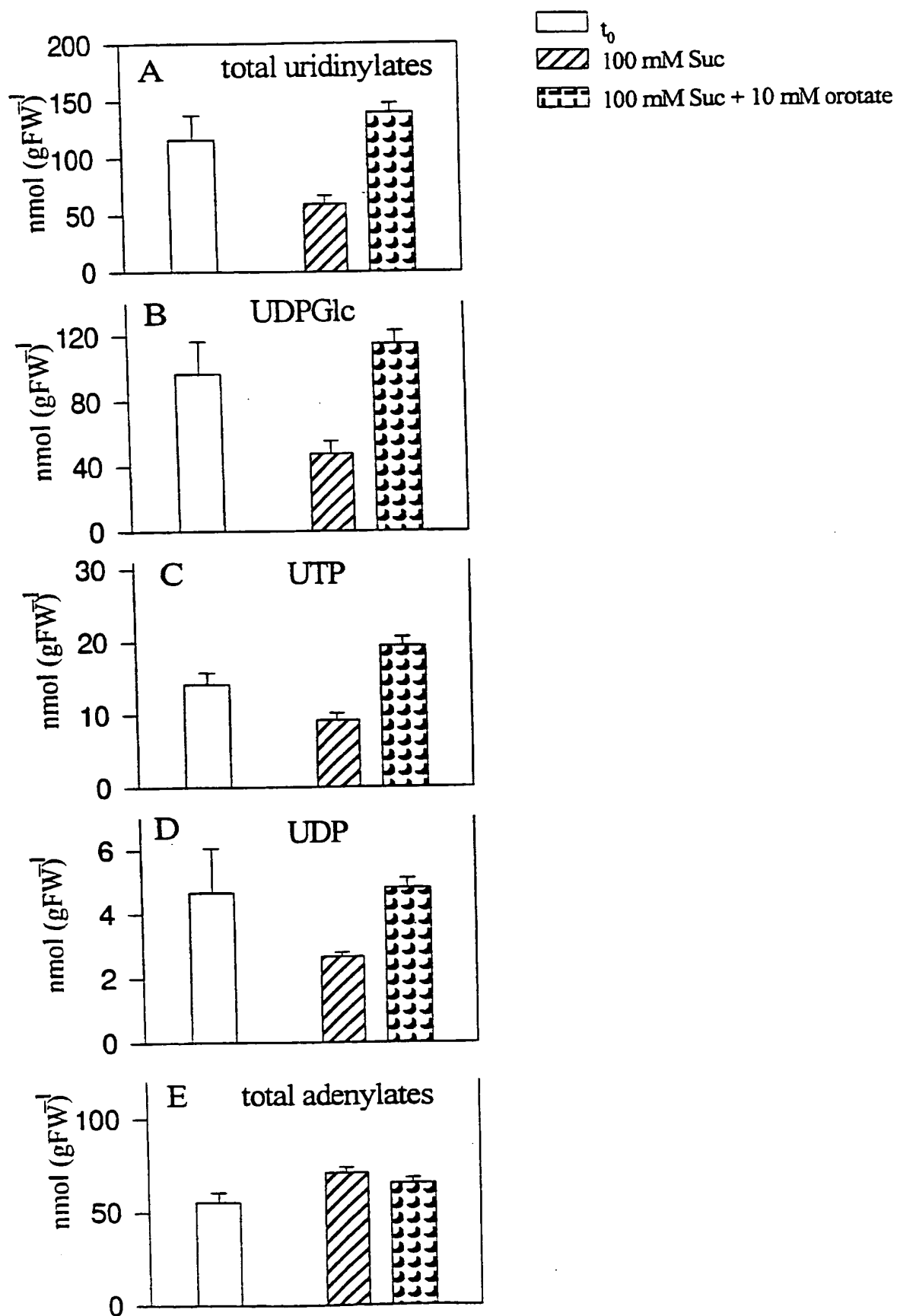
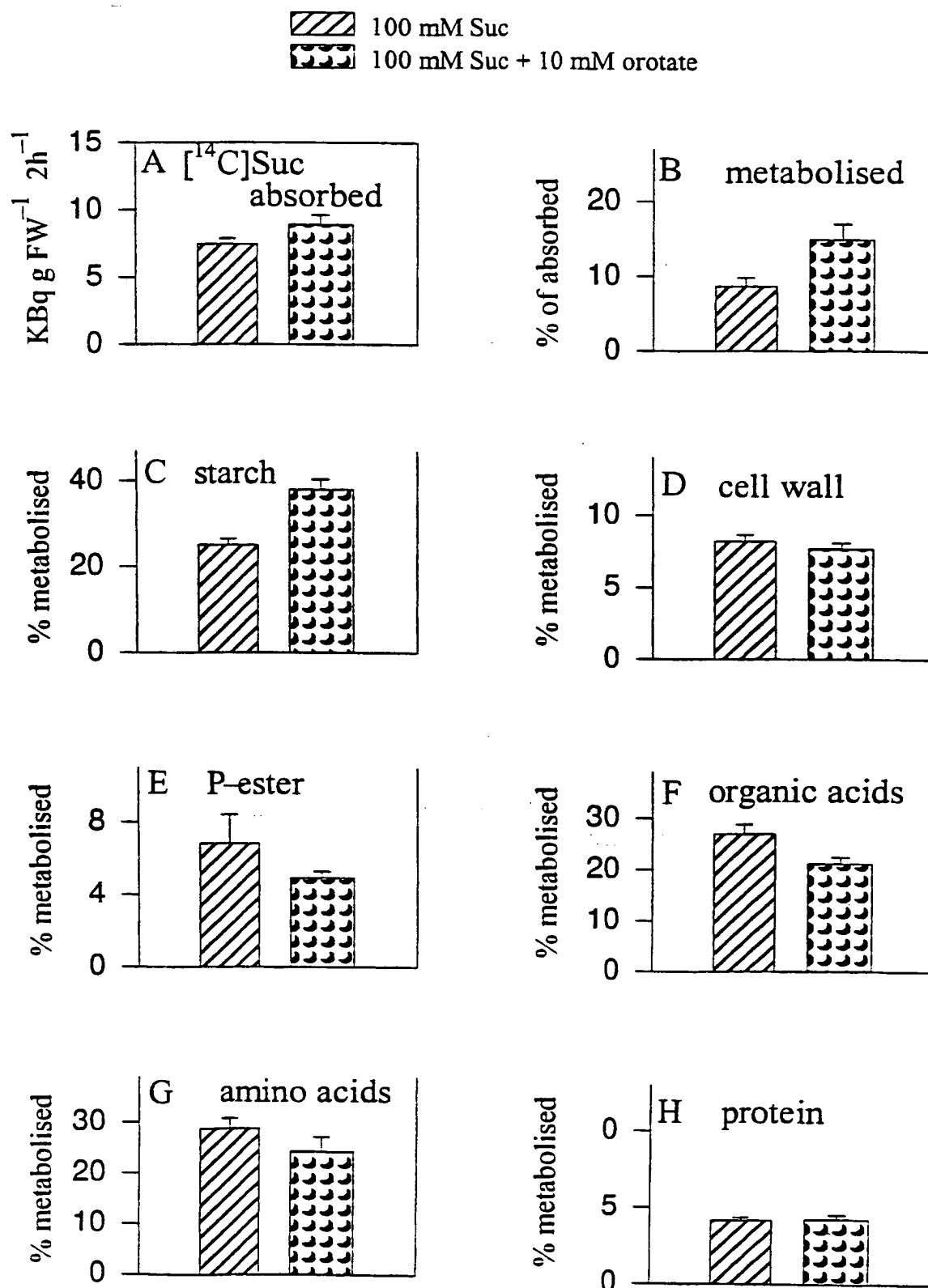
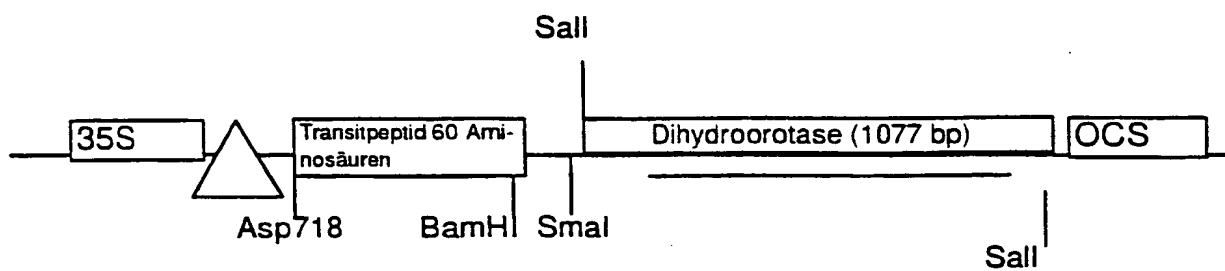
FIG.3

FIG.4

5/5

FIG.5

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Erhoehung des Polysaccharidgehaltes in Pflanzen

<130> NAE540-99

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1271

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (9)..(1046)

<400> 1

```

ttgcaaaa atg gag ctc tca atc aca caa cct gat gat tgg cat ctt cat 50
      Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His
        1             5             10

ctc cgt gat ggt gat gtt ctt aag gca gtt gtc tct cac agt gca cat 98
Leu Arg Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His
  15             20             25             30

cac ttt ggg agg gca ata gtc atg cca aat ttg aag cct cct atc act 146
His Phe Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr
      35             40             45

acc act gct gct gct gta gca tac cgg gag gcg ata ttg aaa tct tta 194
Thr Thr Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu
      50             55             60

cct gtt gat agt gat ttc aac cct ctt atg aca ctt tat ttg aca gat 242
Pro Val Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp
      65             70             75

aca acc agt cct atg gaa atc aaa cta gca aga gag agc cag gtc gta 290
Thr Thr Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val
      80             85             90

```

ttt ggg gtg aag ttg tac cct gct ggt gcc acg aca aat tct caa gat	338
Phe Gly Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp	
95 100 105 110	
gga gtg act gat ctt ttc ggg aag tgt tta cca gtt cta caa gaa atg	386
Gly Val Thr Asp Leu Phe Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Gln Glu Met	
115 120 125	
gtt gag cat aat atg cct ctg ctg gtt cat gga gag gtt act aat cct	434
Val Glu His Asn Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asn Pro	
130 135 140	
gag gtt gac atg ttt gat aga gaa aag gta ttc att gaa acg gtt cta	482
Glu Val Asp Met Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Thr Val Leu	
145 150 155	
aga ccg ttg gtg cag aaa ttt cca caa ttg aag gtc gtg atg gag cat	530
Arg Pro Leu Val Gln Lys Phe Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His	
160 165 170	
gtt acc acc att gat gct gtt aag ttt gtt gaa tct tgc act gaa gga	578
Val Thr Thr Ile Asp Ala Val Lys Phe Val Glu Ser Cys Thr Glu Gly	
175 180 185 190	
ttt gtt gca gca act gtc acc cca caa cat ctt gtt ttg aac agg aat	626
Phe Val Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn	
195 200 205	
tct ctc ttc caa ggg ggc tta caa ccg cat aat tac tgc ctt cca gtc	674
Ser Leu Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val	
210 215 220	
ctc aaa aga gag atc cac agg gag gca ctt gtg tca gct gta aca agt	722
Leu Lys Arg Glu Ile His Arg Glu Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser	
225 230 235	
gga agt aaa aga ttt ttt ctt ggg act gat agt gct cct cat gat aga	770
Gly Ser Lys Arg Phe Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Asp Arg	
240 245 250	
cga aga aaa gag tgt tct tgt gga tgt gct ggt att tac aat gca cct	818
Arg Arg Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ala Pro	
255 260 265 270	
gta gcc ttg tca gta tat gcg aag gtg ttt gaa aag gaa aat gca ctc	866
Val Ala Leu Ser Val Tyr Ala Lys Val Phe Glu Lys Glu Asn Ala Leu	
275 280 285	

gac aag ctt gaa gca ttc act agc ttc aat gga cca gat ttt tat ggg 914
 Asp Lys Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly
 290 295 300

ctt cct agg aac aac tca aag att aag ttg agt aag acg cca tgg aag 962
 Leu Pro Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys
 305 310 315

gta ccc gaa tcc ttt tct tat gca tca gga gat att att ccc atg ttt 1010
 Val Pro Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe
 320 325 330

gct ggt gaa atg ctc gac tgg ttg ccg gct cct ctc tgagaatcat 1056
 Ala Gly Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu
 335 340 345

ttgtcattct tgtactgtaa tattgtgatt caaccaaaga tatagactgt aggtgtatca 1116

tcttttcttt catgttgatt agatattatc acgatgataa taccctttca gctaataaat 1176

tatggaaaca ataagctttg cacgctcacc aaagtgtccc tgtattctga agttcttaaa 1236

ttgttcgttt gattttgaag atttactgat aaaaaa 1271

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 2

Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His Leu Arg
 1 5 10 15

Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His His Phe
 20 25 30

Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr Thr Thr
 35 40 45

Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu Pro Val
 50 55 60

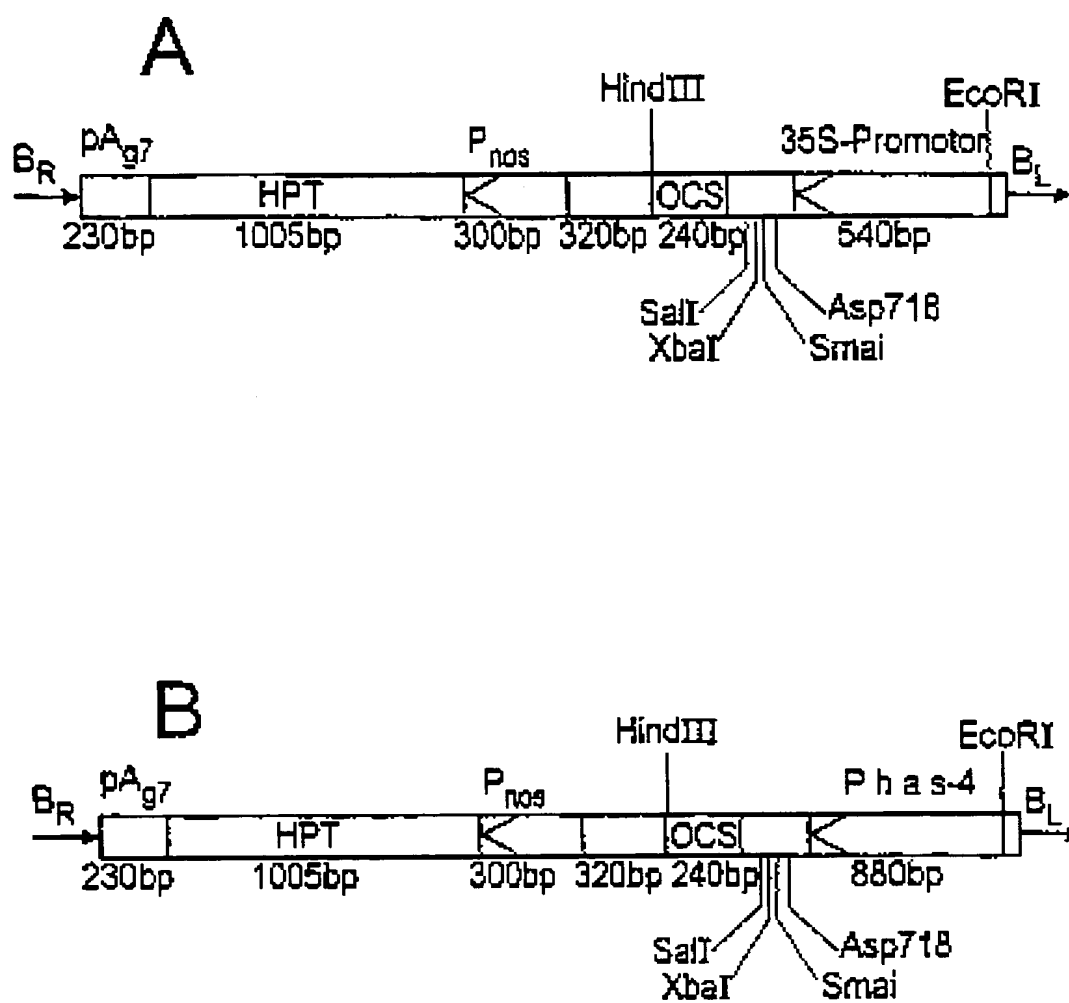
Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Thr Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val Phe Gly

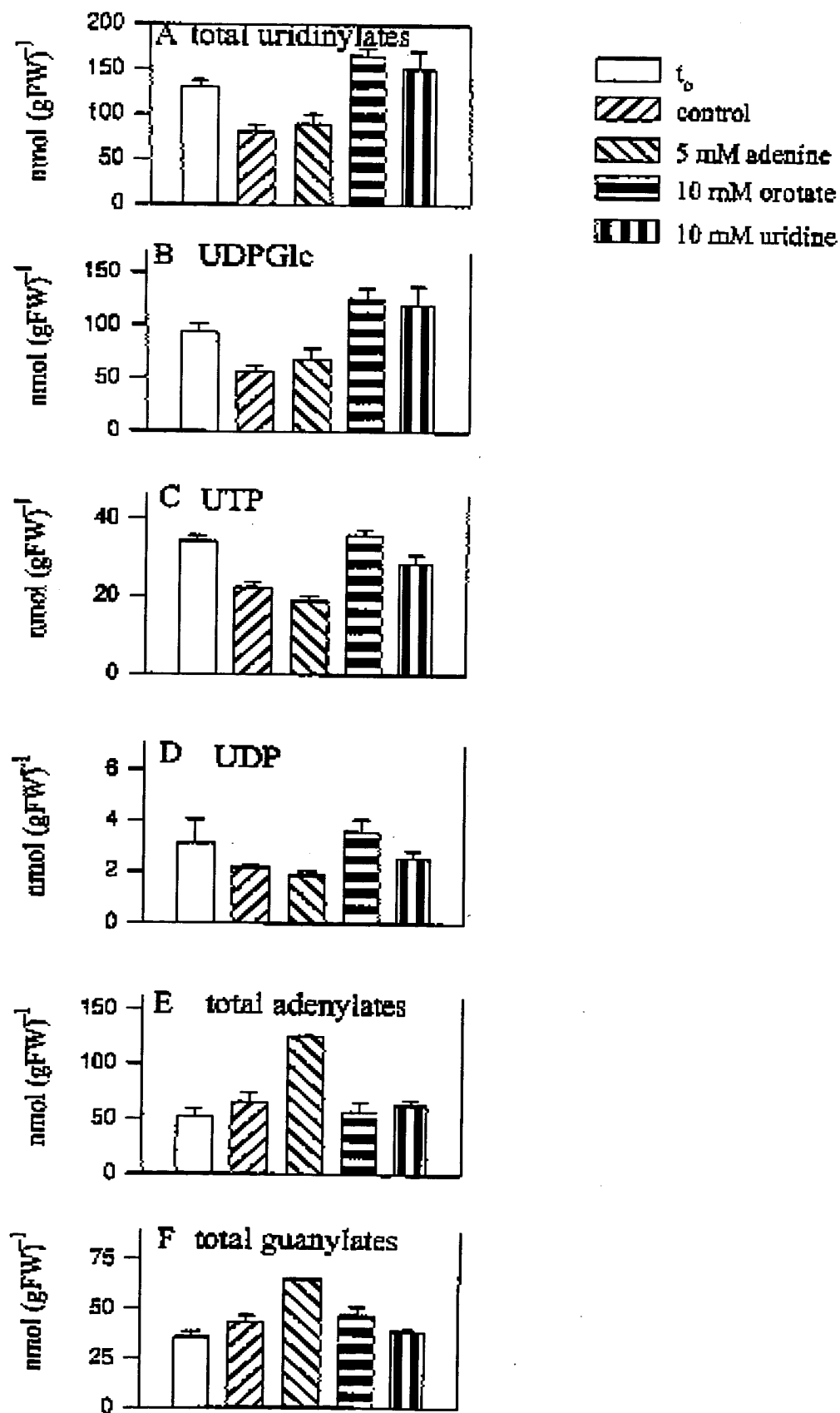
	85		90		95
Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp Gly Val	100		105		110
Thr Asp Leu Phe Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Gln Glu Met Val Glu	115		120		125
His Asn Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asn Pro Glu Val	130		135		140
Asp Met Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Thr Val Leu Arg Pro	145		150		155
					160
Leu Val Gln Lys Phe Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His Val Thr	165		170		175
Thr Ile Asp Ala Val Lys Phe Val Glu Ser Cys Thr Glu Gly Phe Val	180		185		190
Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn Ser Leu	195		200		205
Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val Leu Lys	210		215		220
Arg Glu Ile His Arg Glu Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser Gly Ser	225		230		235
					240
Lys Arg Phe Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Asp Arg Arg Arg	245		250		255
Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ala Pro Val Ala	260		265		270
Leu Ser Val Tyr Ala Lys Val Phe Glu Lys Glu Asn Ala Leu Asp Lys	275		280		285
Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly Leu Pro	290		295		300
Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys Val Pro	305		310		315
					320
Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe Ala Gly	325		330		335
Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu					

340

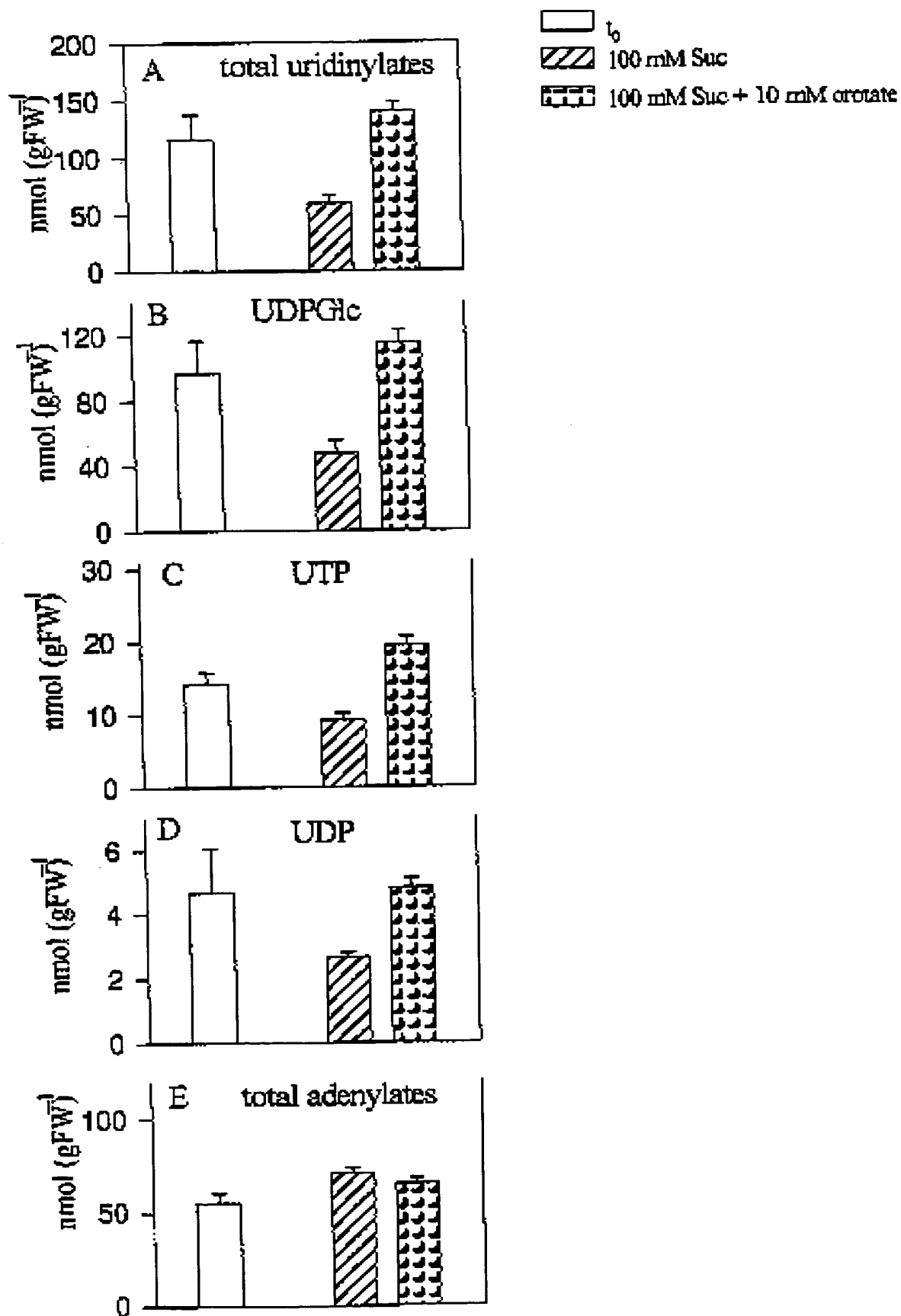
345

FIG.1

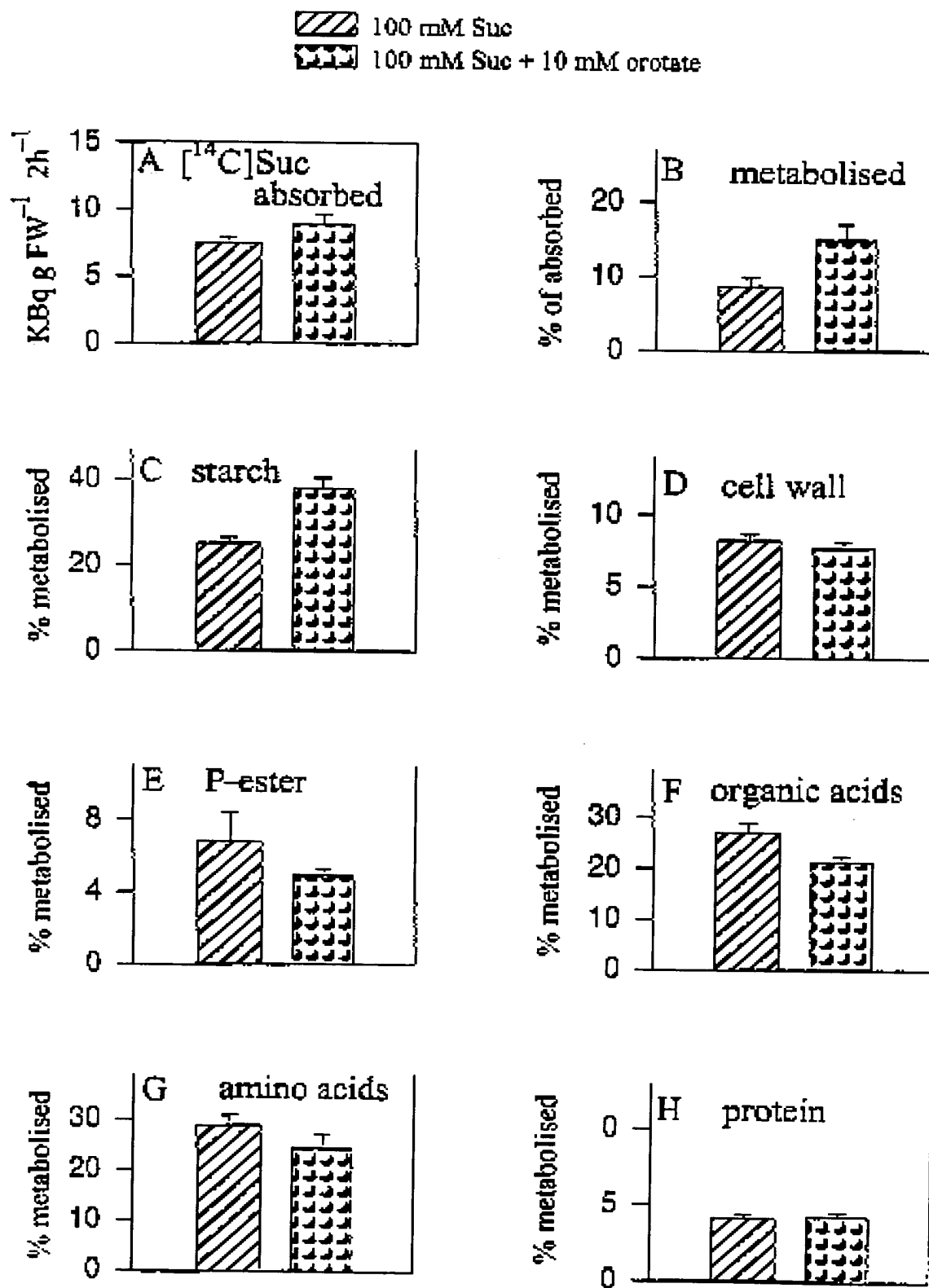
2/5

FIG.2

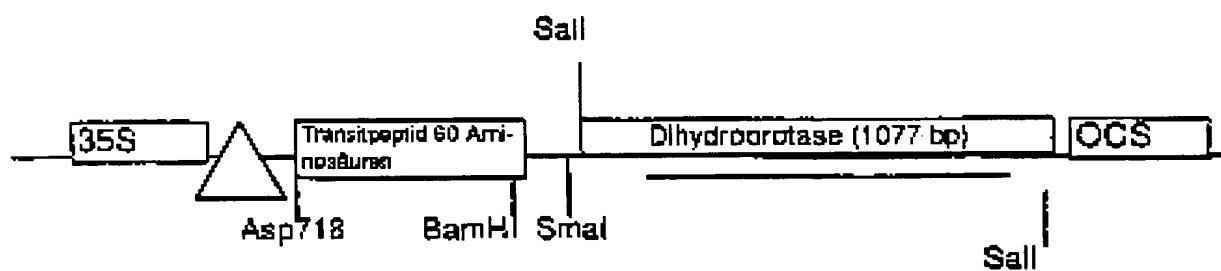
3/5

FIG.3

4/5

FIG.4

5/5

FIG.5

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Erhöhung des Polysaccharidgehaltes in Pflanzen

<130> NAE540-99

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1271

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (9)..(1046)

<400> 1

```

ttgcacaa atg gag ctg tca atc aca caa cct gat gat tgg cat ctt cat   50
Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His
      1              5              10

```

```

ctc cgt gat ggt gat gtt ctt aag gca gtt gtc tct cac agt gca cat   98
Leu Arg Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His
    15              20              25              30

```

```

cac ttt ggg agg gca ata gtc atg cca aat ttg aag cct cct atc aat   146
His Phe Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr
      35              40              45

```

```

acc aat gct gct gct gta gca tac cgg gag ggg ata ttg aaa tct tta   194
Thr Thr Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu
      50              55              60

```

```

cct gtt gat agt gat ttc aac cct ctt atg aca ctt tat ttg aca gal   242
Pro Val Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp
      65              70              75

```

```

aca acc agt cct atg gaa atc aaa cta gca aga gag agc cag gtc gta   290
Thr Thr Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val
      80              85              90

```

ttt ggg gtg aag ttg tac cct gct ggt gcc acc aca aat tct caa gat	338
Phe Gly Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp	
95 100 105 110	
gga gtg act gat ctt ttc ggg aag tgt tta cca gtt cta caa gaa atg	386
Gly Val Thr Asp Leu Phe Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Gln Glu Met	
115 120 125	
gtt gag cat aat atg cct ctg ctg gtt cat gga gag gtt act aat cct	434
Val Glu His Asn Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asn Pro	
130 135 140	
gag gtt gac atg ttt gat aga gaa aag gta ttc att gaa acc gtc cta	482
Glu Val Asp Met Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Thr Val Leu	
145 150 155	
aga ccg ttg gtg cag aaa ttt cca caa ttg aag gtc gtg atg gag cat	530
Arg Pro Leu Val Gln Lys Phe Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His	
160 165 170	
gtt acc acc att gat gct gtt aag ttt gtt gaa tct tgc act gaa gga	578
Val Thr Thr Ile Asp Ala Val Lys Phe Val Glu Ser Cys Thr Glu Gly	
175 180 185 190	
ttt gtt gca gca act gtc acc cca caa cat ctt gtt ttg aac agg aat	626
Phe Val Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn	
195 200 205	
tct ctc ttc caa ggg ggc tta caa ccg cat aat tac tgc ctt cca gtc	674
Ser Leu Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val	
210 215 220	
ctc aaa aga gag atc cac agg gag gca ctt gtg tca gct gta aca agt	722
Leu Lys Arg Glu Ile His Arg Glu Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser	
225 230 235	
gga agt aaa aga ttt ttt ctt ggg act gat agt gct cct cat gat aga	770
Gly Ser Lys Arg Phe Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Asp Arg	
240 245 250	
aga aga aaa gag tgt tct tgt gga tgl gct ggt att tac aat gca cct	818
Arg Arg Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ala Pro	
255 260 265 270	
gta gcc ttg tca gta tac gcg aag gtg ttt gaa aag gaa aat gca ctc	866
Val Ala Leu Ser Val Tyr Ala Lys Val Phe Glu Lys Glu Asn Ala Leu	
275 280 285	

gac aag ctt gaa gca ttc act agc ttc aat gga cca gat ttt tat ggg 914
 Asp Lys Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly
 290 295 300

ctt cct agg aac aac tca aag att aag ttg agt aag acg cca tgg aag 962
 Leu Pro Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys
 305 310 315

cta ccc gaa tcc ttt tct tat gca tca gga gat att att ccc atg ttt 1010
 Val Pro Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe
 320 325 330

gct ggt gaa atg ctc gac tgg ttg ccg gct cct ctc tgagaaatcat 1056
 Ala Gly Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu
 335 340 345

ttgtcattct tgtactgtaa taattgtgatt caacczaaga tatagactct aggtgtatca 1116

tcttttcttt catgttgatt agatattatc acgatgataa tatcctttca gctaataant 1176

tatggasaca ataagctttg cacgctcacc aaagtgtctcc tctattctga agttcttaaa 1236

ttgttcgttt gattttgaag atttactgat aaaaa 1271

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 2

Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His Leu Arg
 1 5 10 15

Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His His Phe
 20 25 30

Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr Thr Thr
 35 40 45

Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu Pro Val
 50 55 60

Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Thr Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val Phe Gly

	85		90		95										
Val	Lys	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Asn	Ser	Gln	Asp	Gly	Val
	100							105					110		
Thr	Asp	Leu	Phe	Gly	Lys	Cys	Leu	Pro	Val	Leu	Gln	Glu	Met	Val	Glu
	115						120					125			
His	Asn	Met	Pro	Leu	Leu	Val	His	Gly	Glu	Val	Thr	Asn	Pro	Glu	Val
	130						135				140				
Asp	Met	Phe	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Ile	Glu	Thr	Val	Leu	Arg	Pro
145					150					155					160
Leu	Val	Gln	Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Lys	Val	Val	Met	Glu	His	Val	Thr
				165					170					175	
Thr	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	Phe	Val	Glu	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly	Phe	Val
	180							185						190	
Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Pro	Gln	His	Leu	Val	Leu	Asn	Arg	Asn	Ser	Leu
	195						200					205			
Phe	Gln	Gly	Gly	Leu	Gln	Pro	His	Asn	Tyr	Cys	Leu	Pro	Val	Leu	Lys
	210					215					220				
Arg	Glu	Ile	His	Arg	Glu	Ala	Leu	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Ser	Gly	Ser
225					230					235					240
Lys	Arg	Phe	Phe	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ala	Pro	His	Asp	Arg	Arg	Arg
				245					250					255	
Lys	Glu	Cys	Ser	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Ile	Tyr	Asn	Ala	Pro	Val	Ala
		260						265					270		
Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Asp	Lys
		275					280					285			
Leu	Glu	Ala	Phe	Thr	Ser	Phe	Asn	Gly	Pro	Asp	Phe	Tyr	Gly	Leu	Pro
	290					295					300				
Arg	Asn	Asn	Ser	Lys	Ile	Lys	Leu	Ser	Lys	Thr	Pro	Trp	Lys	Val	Pro
305					310					315					320
Glu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asp	Ile	Ile	Pro	Met	Phe	Ala	Gly
				325					330					335	
Glu	Met	Leu	Asp	Trp	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu						

340

345